

B10



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 563 527 A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **93101279.3**

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/77, C12N 15/11,
C12P 19/34**

(22) Anmeldetag: **28.01.93**

Der Anmelder hat nachträglich ein Sequenzprotokoll eingereicht und erklärt, dass dieses keine neuen Angaben enthält.

(30) Priorität: **19.03.92 DE 4208785**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
06.10.93 Patentblatt 93/40

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE DE FR GB IT

(71) Anmelder: **Degussa Aktiengesellschaft
Weissfrauenstrasse 9
D-60311 Frankfurt(DE)**

(72) Erfinder: **Schäfer, Andreas
Bündenerstrasse 33**

W-4800 Bielefeld 1(DE)

Erfinder: **Seep-Feldhaus, Anna-Hildegard**

Enniskillener Strasse 141

W-4800 Bielefeld 14(DE)

Erfinder: **Jäger, Wolfgang**

Rolandstrasse 34A

W-4800 Bielefeld 1(DE)

Erfinder: **Kallnowski, Jörn, Dr.**

Schlosshofstr. 123

W-4800 Bielefeld 1(DE)

Erfinder: **Wohlleben, Wolfgang, Dr.**

Dürerstrasse 46

W-4800 Bielefeld 1(DE)

Erfinder: **Pühler, Alfred, Prof. Dr.**

Am Waldschlösschen 2

W-4800 Bielefeld 15(DE)

(54) **Verfahren zum Auffinden von Insertionselementen (IS-Elemente) oder Transposonen.**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Auffinden von Insertionselementen (IS-Elemente) oder Transposonen in coryneformen Bakterien, ein dazu geeignetes positives Selektionssystem, die so gefundenen IS-Elemente und ihre Verwendung.

Das Verfahren umfaßt:

- 1.1. die Konstruktion eines aus einem E.coli Mobilisatorstamm mobilisierbaren, nicht selbsttransferierbaren Vektors, zusammengesetzt aus
 - 1.1.1 einem DNA-Segment, enthaltend ein in E.coli funktionelles Replikon,
 - 1.1.2 einem zweiten DNA-Segment, enthaltend das für die Mobilisierungsfunktion codierende DNA-Fragment (Mob-site enthaltend den oriT),
 - 1.1.3 einem dritten DNA-Segment, das in Gram-positiven Bakterien homolog rekombiniert und/oder ein in coryneformen Bakterien funktionelles Replikon enthält
 - 1.1.4 einem das sacB-Gen enthaltenden DNA-Segment aus Bacillus subtilis,
- 1.2. Übertragung dieses Vektors durch konjugativen Transfer in die coryneformen Rezipientenstämmen,
- 1.3. Anzucht der den Vektor enthaltenden Transkonjuganten in einem 10 % Sucrose enthaltenden Nährmedium,
- 1.4. Lyse der Sucrose-resistenten Klone, Spaltung der Plasmide mit Restriktionsendonucleasen und Analyse der Fragmente.

EP 0 563 527 A1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Auffinden von Insertionselementen (IS-Elemente) oder Transposonen in coryneformen Bakterien, ein dazu geeignetes positives Selektionssystem, die so gefundenen IS-Elemente und ihre Verwendung.

Insertionselemente (IS-Elemente) sind DNA-Bereiche von etwa 0,6 bis 1,8 Kilobasen (kb) Länge, die in prokaryontischen Genomen innerhalb eines Replikons oder von einem Replikon zu einem anderen springen (transponieren) können (Craig & Kleckner 1987, in Neidhardt et al. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology, pp. 1054-1074, ASM Press, Washington, DC). Dabei kann es entweder zur konservativen Transposition kommen, d. h. ein Element wechselt seinen Platz, oder es kommt zur replikativen Transposition, wobei nur eine Kopie des Elements am neuen Insertionsort integriert, während das Original am alten Platz verbleibt. Bei der replikativen Transposition kann es zur Verschmelzung des Donor- und des Akzeptormoleküls kommen (Replikonfusion). Dieses Zwischenstadium der Transposition kann dann durch Rekombination der an den Fusionspunkten liegenden Kopien der IS-Elemente wieder aufgelöst werden. Bei geeigneter Selektion auf die Replikonfusion kann diese aber erhalten werden. IS-Elemente selbst sind im Gegensatz zu den nahe verwandten Transposonen nicht mit einer selektionierbaren Markierung ausgestattet.

IS-Elemente kodieren meistens nur für ein einziges Genprodukt, die sogenannte Transposase. Es handelt sich hierbei um ein Rekombinationsprotein, das von einem oder zwei offenen Leserastern des Insertionselements abgelesen wird und das die Transposition durch die sogenannte illegitime, d. h. vom Rekombinationssystem des Wirtsorganismus unabhängige Rekombination an den invers repetitiven Enden des Elements durchführt.

Bei der Transposition von Insertionselementen in ein bakterielles Gen wird dieses gewöhnlich zerstört, also eine Mutation erzeugt (Craig & Kleckner 1987 s.o.).

Daneben kann es durch polare Effekte, das Unterbrechen der Transkription eines Operons durch die Integration in ein vorderes Gen, zur Abschaltung weiter hinten liegender Gene kommen.

Endogene Insertionselemente können zur genetischen Instabilität eines natürlichen oder rekombinanten Mikroorganismus beitragen. Dabei werden neben Insertionen von IS-Elementen auch Deletionen angrenzender Bereich oder andere Umordnungen von DNA erzeugt. Weiterhin ist bekannt, daß Insertionselemente die Stabilität von Plasmiden besonders unter Produktionsbedingungen negativ beeinflussen können (Kumar et al. *Trends Biotech.* 9:279-284, 1991).

Insertionselemente wurden bisher schon in einer Anzahl verschiedener Bakteriengattungen nachgewiesen. Bei den Gram-positiven Bakterien sind Insertionselemente vor allem aus den Gattungen *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* und *Streptomyces* bekannt.

Insertionselemente aus coryneformen Bakterien, insbesondere Aminosäuren produzierenden, sind bisher noch nicht beschrieben worden.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Auffinden von Insertionselementen in coryneformen Bakterien und das dazu gehörige positive Selektionssystem zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Auffinden von Insertionselementen (IS-Elementen) und Transposonen in coryneformen Bakterien bzw. die Untersuchung dieser Bakterien auf die Anwesenheit derartiger Elemente das umfaßt:

- 1.1. die Konstruktion eines aus einem E.coli Mobilisatorstamm mobilisierbaren, nicht selbsttransferierbaren Vektors, zusammengesetzt aus
 - 1.1.1 einem DNA-Segment, enthaltend ein in E.coli funktionelles Replikon,
 - 1.1.2 einem zweiten DNA-Segment, enthaltend das für die Mobilisierungsfunktion codierende DNA-Fragment (Mob-site enthaltend den oriT).
 - 1.1.3 einem dritten DNA-Segment, das in Gram-positiven Bakterien homolog rekombiniert und/oder ein in coryneformen Bakterien funktionelles Replikon enthält,
 - 1.1.4 einem das sacB-Gen enthaltenden DNA-Segment aus *Bacillus subtilis*.
- 1.2. Übertragung dieses Vektors durch konjugativen Transfer in die coryneformen Rezipientenstämmе,
- 1.3. Anzucht der den Vektor enthaltenden Transkonjuganten in einem ~ 10 % Sucrose-haltigen Nährmedium,
- 1.4. Lyse der Sucrose-resistenten Klone, Spaltung der Plasmide mit Restriktionsendonucleasen und Analyse der Fragmente.

Die Konstruktion der geeigneten Vektoren -jedoch nicht deren Wirkung als Fangvektoren- wird im Prinzip ebenso wie das Verfahren zum konjugativen Transfer in der DE-OS 38 41453 beschrieben.

Dieses ist dadurch gekennzeichnet, daß man bevorzugt restriktionsdefekte Zellen eines Gram-positiven Bakteriums herstellt und diese nach an sich bekannten Kreuzungsverfahren mit einem den mobilisierbaren Vektor tragenden E.coli Mobilisatorstamm mischt. Das Fehlen eines funktionsfähigen Restriktionssystems bzw. der Hitzeschock erleichtert den Transfer, es ist aber nicht eine notwendige Voraussetzung dafür.

Während sich der Donor bevorzugt in der logarithmischen Wachstumsphase befindet, hat sich für den Zustand des Rezipienten die stationäre Wachstumsphase als günstig erwiesen.

Donor- und Rezipientenzellen werden im allgemeinen im Verhältnis 1 : 1 bis 1 : 10, bevorzugt 1 : 1 bis 1 : 6, eingesetzt.

5 Die geeigneten mobilisierbaren Vektoren sind nicht selbsttransferierbar.

Unter Punkt 1.1 verstehen sich allgemein alle in E.coli-Stämmen selbständig replizierenden Plasmide (Vektoren), die sich nach dem Stand der Technik als für gentechnologische Anwendungen nützlich erwiesen haben.

10 Beispiele solcher E.coli Vektoren sind pMB9, pBR322, pBR325, pKB111, pUC8, pUC9, pACYC184, pACYC177, pSC101.

Übliche E.coli Vektoren wie pBR325 (Bolivar, F. et al., Gene 2, 95, (1977) oder pACYC184 (Chang, A.C.Y. und Cohen, S.N., J. Bact. 134, 1141 (1978) sind weder selbsttransferierbar noch ausreichend mobilisierbar.

15 Diese und andere Vektoren, die nur in Bakterienstämmen der E.coli-Gruppe replizieren, werden durch Insertion der Mob-site eines Plasmids mit weitem Wirtsbereich in Gram-negativen Bakterien modifiziert.

Bevorzugt wird das Plasmid RP4 für diese Zwecke verwendet. Derartige Vektoren, die ein ~ 1,9 kb großes Fragment (Mob-site) von RP4 tragen, lassen sich in dem erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft einsetzen.

20 Als Mobilisatorstämme geeignet sind modifizierte E.coli-Stämme, die ein Plasmid im Chromosom integriert oder frei vorliegend enthalten, das in der Lage ist, die zur Mobilisierung notwendigen Funktionen bereitzustellen.

Es eignen sich insbesondere Stämme, in deren Chromosom ein RP4-Derivat integriert ist, dessen Transfer-Funktion in trans auf die Mob-site der oben genannten Vektoren einwirkt.

25 Geeignete Vektoren und E.coli Mobilisatorstämme, wie z. B. SM-10, S68-7 und S17-1 sind aus der US-PS 4,626,504 bekannt. Der den Transfer erleichternde Restriktionsdefekt kann genetisch bedingt sein und z. B. durch mutagene Agentien (z. B. NTG: Methylnitrosoguanidin), erzeugt werden, er kann aber auch physiologisch bedingt sein, z. B. durch einen Hitzeschock. Als besonders effektiv hat sich die Hitzebehandlung des Rezipienten unmittelbar vor der Kreuzung erwiesen. Dabei sind intakte oder sphäroplastierte Zellen einzusetzen.

30 Damit gelingt es erstmals, gezielt Insertionselemente in Gram-positiven Bakterien zu finden.

Das für diesen Zweck eingesetzte positive Selektionssystem (sacB-System) zum Auffinden von Insertionselementen in coryneformen Bakterien umfaßt einen mobilisierbaren, nicht selbsttransferierbaren Vektor, der zusammengesetzt ist aus:

- a) einem DNA-Segment, enthaltend ein in E.coli funktionelles Replikon,
- 35 b) einem zweiten DNA-Segment, enthaltend das für die Mobilisierungsfunktion codierende DNA-Fragment (Mob-site enthaltend den *oriT*),
- c) einem dritten DNA-Segment, das in Gram-positiven Bakterien homolog rekombiniert und gegebenenfalls ein in coryneformen Bakterien funktionelles Replikon enthält, und
- d) einem das *sacB*-Gen enthaltenden DNA-Segment aus *Bacillus subtilis*.

40 Für die erfindungsgemäße Isolierung von Insertionssequenzen (IS-Elementen) oder Transposonen wird das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis* verwendet (Gay et al., J. Bacteriol. 153:1424-1431, 1983) Das Gen kodiert für das Exoenzym Levansucrase, welches die Reaktionen Saccharosehydrolyse und Levan-Synthese katalysiert (Dedonder et al., Methods in Enzymol. 8:500-505, 1966). Die Expression von *sacB* in E.coli führt zum Transport des Enzyms ins Periplasma (Steinmetz et al. Mol. Gen. Genet. 191:138-144, 1983) und ist für E.coli und andere Gram-negative Bakterien letal auf Medien mit über 5 % Sucrose (Gay et al., J.Bacteriol. 164:918-921).

Es wurde nun gefunden, daß die Expression des intakten *sacB*-Genes auch in Gram-positiven Bakterien, wie z. B. in *C.glutamicum* und anderen coryneformen Bakterien zu Letalität auf Medien mit 10 % Sucrose führt.

50 Kolonien mit einem inaktivierten *sacB*-Gen können daher auf derartigen Medien positiv selektioniert werden, da in diesen Fällen die Inaktivierung durch Insertionselemente, die in *sacB* inseriert sind, bewirkt wird. Dieses wird dann durch eine Restriktionsanalyse lokalisiert.

Bevorzugt eingesetzt wird der das *sacB*-Gen enthaltende Fangvektor pWJ5, dessen Restriktionskarte in Abb. 3 wiedergegeben wird.

55 Er leitet sich aus den Plasmiden pECM1 (DE-OS 3841453) und pUM24 (Ried und Collmer, Gene 57, (1987) 239-246) ab.

Nach dem Restringieren des Plasmids pUM24 mit den Enzymen BamHI und EcoRV entsteht ein ~ 1,9 kb großes DNA-Fragment, welches das *sacB*-Gen trägt und bevorzugt eingesetzt wird.

Auf diesem Weg wurde drei verschiedene, für die jeweiligen Bakteriengattungen offensichtlich charakteristische IS-Elemente in einer Reihe von coryneformen Bakterien gefunden, die nach ihrer Herkunft als ISCg1, ISB11 und ISRf1 bezeichnet werden (Tabellen 1 und 2). Dabei kann der Wirtsbereich über die Gattung des Bakteriums, in dem das jeweilige IS-Element gefunden wurde, hinausgehen.

5 Durch Hybridisierung Digoxigenin-d-UTP markierter DNA von IS-Elementen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren identifiziert wurden, gegen z. B. mit EcoRI oder einer anderen geeigneten Endonuclease gespaltene Gesamt-DNA aus dem zu untersuchenden Mikroorganismus werden dann eventuell vorhandene weitere Kopie dieser IS-Elemente im Genom dieses Stammes nachgewiesen.

10 Gegenstand der Erfindung sind somit insbesondere die in Tabelle 2 aufgeführten IS-Elemente, für die besonders charakteristisch die Gesamtlänge, die Länge IR und die Länge DR sind.

In den Sequenzen der invers repetitiven Enden können natürlich Basen äquivalent ersetzt sein, ohne daß sich die Wirksamkeit ändert, in der Weise, wie es dem Fachmann auch geläufig ist. Das gilt ebenso für die identifizierte Nucleotidsequenz von ISCg1 (Tab. 2/1, 2/2).

15

Tabelle 1:

Test verschiedener coryneformer Bakterien auf Funktion
des sacB Genes

20

Stamm mit Vektor pWJ5	Sensitivität gegen 10 % Sucrose	Auftreten Insertionen resisten- in pWJ5 ter Klone
--------------------------	---------------------------------------	---

25

C. glutamicum

ATCC 13032	s	+ +
------------	---	-----

ATCC 13058	s	+ -
------------	---	-----

AS019	s	+ +
-------	---	-----

30

<i>C. herculis</i>	s	+ +
--------------------	---	-----

C. acetoacid-

<i>ophilum</i> ATCC21350	s	+ -
--------------------------	---	-----

35

<i>B. flavum</i> ATCC14067	s	+ +
----------------------------	---	-----

B. lactofermentum

ATCC13869	s	+ +
-----------	---	-----

40

B. divaricatum

DSM20297	s	+ -
----------	---	-----

<i>R. fascians</i> DM200-1	s	+ +
----------------------------	---	-----

<i>R. fascians</i> DM200-2	s	+ +
----------------------------	---	-----

45

Abkürzungen:

C.: *Corynebacterium*; B.: *Brevibacterium*;

R.: *Rhodococcus*.

50

55

Tabelle 2

Eigenschaften der gefundenen IS-Elemente.			
Name	ISCg1	ISBl1	ISRf1
Organismus	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	<i>Rhodococcus fascians</i>
Gesamtlänge	~1,45 kb	~1,45 kb	~1,3 kb
Länge IR	24 bp	26 bp	18 bp
Länge DR	8 bp	8 bp	3 bp
Kopien im Wirt	4-7	4	3
Wirtsbereich	<i>C. herculis</i> <i>B. flavum</i> <i>R. fascians</i>		
IR: invers repetitive Enden DR: direkt repetitive Zielsequenz kb: Kilobasenpaare bp: Basenpaare			

Sequenzen der invers repetitiven Enden^{*)**)}

IR-L G G C c C T T C C g G T T T T g G g G T a C A T c a
ISCg1

IR-R G G C t C T T C C t G T T T T a G a G T g C A T t g

IR-L G G C T C T T C C G T T t T T A G A G T G C A T T G
ISBl1

IR-R G G C T C T T C C G T T g T T A G A G T G C A T T G

IR-1 G G a C C t G A C C C C c A T t T G
ISRf1

IR-2 G G g C C c G A C C C C g A T a T G

^{*)}: Kleinbuchstaben symbolisieren nichthomologe Basenpaare.

^{**)}: ISCg1 und ISBl1 besitzen ca. 75% Sequenzhomologie.

Anhand einer Mutante von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 kann die Wirkung eines IS-Element demonstriert werden.

Die *C. glutamicum* Mutante LT 5.5 ist eine direkt vom *C. glutamicum* Wildtyp-Stamm ATCC13032 abgeleitete, spontan S-(2-Aminoethyl)-cystein (AEC) resistente Mutante, die einen Defekt in der Lysinaufnahme aufweist. Das *lysI*-Gen ist das in *C. glutamicum* für die Lysinaufnahme verantwortliche Gen. Dieses und die angrenzenden DNA Regionen sind kloniert und die Nukleotidsequenz des *lysI*-Gens bekannt.

Seep-Feldhaus, A.-H., Kalinowski, J. und Pühler, A. (1991) Mol. Microbiol. 5:2995-3005.

Hybridisiert man ein mit Dioxygenin-d-UTP-markiertes, 505 bp SstI-PstI DNA Fragment aus der *lysI* Kodierregion gegen Gesamt-DNA aus dem *C. glutamicum* Wildtyp-Stamm ATCC13032 und der Mutante LT 5.5, findet man im Wildtyp ein 5 kb großes EcoRI DNA-Fragment, während in der Mutanten LT 5.5 ein ca. 6,5 kb großes EcoRI DNA-Fragment hybridisiert. Die Mutation in dem *lysI*-Gen der Mutante LT 5.5 ist nach diesem Ergebnis auf die Insertion eines ca. 1,45 kb großen DNA-Fragmentes ISCg1 zurückzuführen, dessen Basensequenz aufgeklärt wurde (Abb. 2/1, 2/2).

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens gelingt die Bestätigung des Vorhandenseins dieses auf klassischem Wege gefundenen IS-Elements ISCg1. Gleichzeitig werden fünf IS-Elemente in *C. glutamicum*

ATCC13032 gefunden, die mit Digoxigenin-d-UTP markierter IsCg1-DNA hybridisieren und daher als IS-Elemente vom Typ IsCg1 bezeichnet werden.

Unter Verwendung der erfindungsgemäß aufgefundenen IS-Elemente läßt sich eine Anzahl von bestehenden Problemen lösen:

- 5 Das bisher bei Bakterien angewandte Verfahren mittels Chemikalien Mutagenesen zu erzeugen, hat den Nachteil, daß oft neben der gewünschten noch mehrere andere Mutationen in einer Zelle gesetzt werden, die sich u.U. ungünstig auswirken. Zudem sind die mutierten Gene nicht physikalisch markiert, da chemische Agentien unter den verwendeten Bedingungen meist nur Punktmutationen (Basenaustausch) bewirken.

- 10 Solch ein Basenaustausch oder auch mehrere sind in der Regel nur dazu geeignet, einzelne Gene nicht aber ganze Transkriptionseinheiten abzuschalten.

- Transposonen und Insertionselemente schaffen hierbei insofern Abhilfe, daß pro Zelle im allgemeinen nur ein einzelnes Mutationsereignis erzeugt wird, und eine so erzeugte Mutation physikalisch markiert ist. Diese Markierung besteht entweder in einem selektionierbaren Marker auf dem Transposon oder neben
15 einem Insertionselement oder, bei nicht solcherart konstruierten Insertionselemente, zumindest in einer deutlichen Verlängerung des mutagenisierten Bereichs durch eine bekannte Sequenz, die mittels DNA-Hybridisierung identifiziert werden kann.

- Die mutagene Aktivität von IS-Elementen kann genutzt werden, indem ein selektionierbares Gen (z. B. ein Antibiotika-Resistenzgen) durch Klonierung nach bekannten Verfahren in oder zwischen zwei Kopien
20 eines IS-Elements plaziert wird. Das so entstandene (composite) Transposon kann zur Mutagenese benutzt werden, wobei das mutierte Gen durch das selektionierbare Gen physikalisch markiert ist.

Damit wird der Einsatzbereich der Transposonmutagenese erweitert.

- Bei der detaillierten Analyse von bekannten C.glutamicum Transposon-Mutanten stellt sich heraus, daß in manchen Fällen auch endogene IS-Elemente ihren Platz im Genom von C.glutamicum gewechselt haben.
25 Es ist dann nicht eindeutig festzustellen, ob das Transposon oder ein Insertionselement die phänotypisch zu beobachtende Mutation erzeugt hat. Endogene Insertionselemente können also einen störenden Hintergrund bei der Transposon-Mutagenese darstellen.

- Das erfindungsgemäße Verfahren gestattet es nun, IS-Elemente schnell zu identifizieren und durch DNA-Hybridisierung gegen die Gesamt-DNA in einem Transposon-Mutantenstamm festzustellen, ob das
30 Insertionselement-Muster verändert ist, und damit die Gefahr besteht, daß die beobachtete Mutation durch ein Insertionselement ausgelöst wurde.

- Ebenso gewährleistet die vollständige Entfernung von endogenen Insertionselementen durch "gene-replacement"-Techniken einen Insertionselementfreien Stamm, in dem phänotypische Mutationen eindeutig dem insertierten Transposon zugeordnet werden können. Mit der Verwendung der identifizierten Insertions-
35 elemente als Hybridisierungssonden bzw. der sacB-Technik zur Identifizierung von IS-Elementen können IS-Element-freie Stämme gefunden werden, die sich besser zur Transposon-Mutagenese eignen.

- Unter optimalen Wachstumsbedingungen liegt die Transpositionsrate von IS-Elementen gewöhnlich unter 1×10^{-7} pro Generation. Sie wird allerdings deutlich erhöht, wenn der Mikroorganismus durch Änderungen des äußeren Milieus oder durch Destabilisierung des inneren metabolischen Gleichgewichts
40 unter Streß gesetzt wird. Äußere Streßfaktoren stellen z. B. Hitze, Kälte, Nährstoffmangel oder antibiotische Substanzen wie Aminosäure-Analoga dar (Craig & Kleckner 1987).

- Gerade rekombinante Mikroorganismen oder auxotrophe bzw. auf Hochproduktion selektierte Mutanten weisen ein destabilisiertes inneres Milieu auf und sind aus diesem Grund einer erhöhten Transpositions-
frequenz ausgesetzt.

- 45 Dieser Mechanismus kann auch positiv genutzt werden:

Durch Einsatz der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gefundenen Insertionselemente können beispielsweise angrenzende DNA-Regionen vervielfältigt werden.

- Die IS-Elemente können auch mittels Replikonfusion zur Mutagenese eingesetzt werden. Dabei wird die Replikonfusion und damit die erzeugte Mutation durch Selektion auf diese Fusion stabilisiert. Im Falle einer
50 Fusion zwischen dem bakteriellen Chromosom und einem IS-Element tragenden aber nicht replikationsfähigen Resistenzplasmid dient die Resistenz des Plasmids zur Selektion auf die stabile Replikonfusion.

Durch die Entfernung endogener IS-Elemente nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können die oben angesprochenen Instabilitäten bei Produktionsstämmen bzw. unter Produktionsbedingungen wesentlich reduziert werden.

- 55 Mutagenese und Entfernung endogener IS-Elemente setzen im Prinzip bei dem aus dem DE-PS 4027453 bekannten Verfahren an, bei dem man einen mobilisierbaren E.coli-Vektor, wie er z. B. in Anspruch 1 dieser Erfindung unter den Kennzeichen 1.1.1 bis 1.1.3 aufgeführt wird, der aber als Kennzeichen 1.1.4 ein das entsprechende IS-Element enthaltendes DNA-Fragment aufweist, durch konjugativen Transfer aus

einem E.coli Mobilisatorstamm in das gewünschte coryneforme Bakterium transferiert.

Bispiel 1

5 Mutationsauslösung durch IS-Elemente in *Corynebacterium glutamicum*: Nachweis und Isolierung eines IS-Elementes aus dem *lysI*-Gen der Mutante LT 5.5

Die *C.glutamicum* Mutante LT 5.5 ist eine direkt vom *c.glutamicum* Wildtyp-Stamm ATCC 13032 abgeleitete, spontan S-(2-Aminoethyl)-cystein (AEC) resistente Mutante, die einen Defekt in der Lysinaufnahme aufweist. Das *lysI*-Gen ist das in *C.glutamicum* für die Lysinaufnahme verantwortliche Gen. Das *lysI*-Gen und die angrenzenden DNA Regionen sind kloniert und die Nukleotidsequenz des *lysI*-Gens bekannt (Seep-Feldhaus, A. H. et al., Mol. Microbiol. 5(12): 2995-3005, 1991).

Ein mit Dioxxygenin-d-UTP-markiertes, 505 bp SstI-PstI DNA Fragment aus der *lysI* Kodierregion (Abbildung 1) wurde gegen Gesamt-DNA aus dem *C.glutamicum* Wildtyp-Stamm ATCC 13032 und der Mutante LT 5.5 hybridisiert. Die Gesamt-DNA, isoliert nach der Methode von Altenbuchner und Cullum (Mol.Gen.Genet. 195: 134-138, 1984), wurde zu diesem Zweck mit dem Restriktionsenzym EcoRI gespalten. Die Spaltungsansätze wurden anschließend in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Der Transfer der DNA Fragmente auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham, Braunschweig) erfolgte nach der Methode von Southern (J.Mol.Biol. 98: 503-517, 1975). Die Hybridisierung wurde mit dem "DNA Labeling and Detection Kit nonradioactive" (Boehringer, Mannheim) durchgeführt.

Das als Hybridisierungssonde verwendete SstI-PstI DNA Fragment hybridisiert im *C.glutamicum* Wildtyp-Stamm ATCC 13032 mit einem 5 kb großes EcoRI DNA Fragment, während in der Mutante LT 5.5 ein ca. 6,5 kb großes EcoRI DNA Fragment hybridisiert. Die Mutation in dem *lysI*-Gen der Mutante LT 5.5 ist nach diesem Ergebnis auf die Insertion eines ca. 1,5 kb großen DNA Fragmentes zurückzuführen.

Zur Bestimmung des Insertionsortes des in das *lysI* Gen der Mutante LT 5.5 inserierten DNA Fragmentes wurde die Gesamt-DNA des *C.glutamicum* Wildtyp-Stammes ATCC 13032 und der Mutante LT 5.5 parallel mit den Restriktionsenzymen PvuII und SstI gespalten. Die Spaltungsansätze wurden anschließend im 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Der Transfer der DNA Fragmente und die Hybridisierung mit dem Dioxxygenin-d-UTP-markierten SstI-PstI DNA Fragment aus der *lysI* Kodierregion erfolgte wie oben beschrieben. Die Hybridisierung zeigt, daß in der Mutante LT 5.5 sowohl das 2,8 kb PvuII DNA Fragment als auch das 0,9 kb SstI DNA Fragment (Abbildung 1) um ca. 1,5 kb verlängert ist. Aus den Hybridisierungen folgt, daß die Insertion auf dem 283 bp PvuII-PstI DNA Fragment der *lysI* Kodierregion lokalisiert ist (Abbildung 1).

Zur Klonierung der Insertion wurde das, in der Mutante LT 5.5 vergrößerte PvuII-PstI DNA Fragment zunächst mit Hilfe der "Polymerase Chain Reaction" (Innis, M., A. et al., PCR Protokoll, Academic Press, 1990) amplifiziert.

Die für die PCR-Reaktion eingesetzten Primer sind 20 Basen lange Oligonukleotide mit der folgenden, aus der *lysI* DNA Sequenz abgeleiteten Sequenz:

Primer 1: 5' CAAATCGGGGCCATCAACA 3'

Primer 2: 5' GAGGACAACTGCGGTTCTG 3'

Die PCR-Reaktion wurde mit folgendem Ansatz durchgeführt:

- 500 ng Gesamt-DNA aus der Mutante LT 5.5
- 14 ng Primer 1
- 14 ng Primer 2
- 200 µM d-NTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

gelöst in einem Volumen von 50 µl Taq-Polymerase Reaktionspuffer (Boehringer, Mannheim). Die PCR Reaktion wurde mit dem Gene ATAQ Controller (Pharmacia) durchgeführt. Der Ansatz wurde zunächst 5 min bei 96 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 unit Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim) wurde dann für die Amplifikation des 1,8 kb PvuII-PstI DNA Fragmentes folgender Zyklus 30 mal durchlaufen:

- 1 min 10 sec 53 °C
- 2 min 40 sec 72 °C
- 1 min 10 sec 92 °C

Die amplifizierte DNA wurde in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel isoliert (Geneclean BIO101 Inc., La Jolla, California). Diese DNA wurde mit den Restriktionsenzymen PstI und PvuII gespalten und mit dem PstI und SmaI gespaltenen E.coli Plasmidvektor pK18mob (Patentanmeldung P4027453.5) ligiert. Mit dem Ligationsgemisch wurde der E.coli Stamm DH5α (Woodcock, D., M. et al., Nucleic Acids Res. 17: 3469-3478, 1989) transformiert. Aus den Transformaten konnte ein Plasmid, genannt pSF3, isoliert werden, welches aus dem Vektor pK18mob und aus dem 1,8 kb langen amplifiziertem DNA Fragment besteht.

Beispiel 2**Sequenzanalyse des IS-Elementes aus *C.glutamicum***

5 Das im Plasmid pSF3 (Beispiel 1) klonierte, etwa 1.8 kb große DNA-Fragment aus der *C.glutamicum*-Mutante LT 5.5 wurde nach der Methode von Sanger *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467, 1977) mit den Modifikationen für die Sequenzierung doppelsträngiger DNA (Chen und Seeburg, DNA 4:165-168, 1985) sequenziert.

Dazu wurden mittels durch Restriktionskartierung bestimmter Schnittstellen Deletionsderivate des Plas-
 10 mids pSF3 hergestellt. Da das Plasmid pK18mob zur direkten Sequenzierung geeignet ist, konnten diese Deletionsderivate umgehend zur Sequenzierung eingesetzt werden.

Die Sequenzierung erfolgte mit dem T7-sequencing kit (Pharmacia, Freiburg) und den Primern "universal" bzw. "reverse". Die Nukleotidsequenz wurde von beiden DNA-Strängen vollständig bestimmt (Abbildung 2).

15 Das IS-Element ISCG1 ist 1452 Basenpaare (bp) lang und hat imperfekte invers repetitive Enden von 24 bp Länge.

An der Insertionsstelle im *lysI*-Gen erzeugt es eine direkt repetitive Sequenz von 8 bp. Es trägt zwei offene Leseraster (ORF), die wahrscheinlich für Proteine kodieren. ORF1 (bp 130 bis 417 kodiert für ein Protein von 96 Aminosäuren und ORF2 (bp 321 bis 1436) kodiert für ein Protein von 372 Aminosäuren.

20 ORF1 beginnt mit einem ATG-Startkodon, vor dem sich eine Sequenz mit Ähnlichkeit zu Ribosomenbindungsstellen Gram-positiver Bakterien befindet (bp 117-121 5'-AAAGG-3'). ORF2, der das Ende von ORF1 überlappt, besitzt zwar einige interne mögliche ATG- oder GTG-Startkodons, vor diesen befinden sich allerdings keine sichtbaren Ribosomenbindungsstellen.

Beispiel 3:**Konstruktion eines Vektors für die Isolierung von Insertionssequenzen aus coryneformen Bakterien**

30 Für die Isolierung von Insertionssequenzen (IS-Elementen) oder Transposons wird das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis* verwendet (Gay *et al.*, J.Bacteriol. 153:1424-1431, 1983). Das Gen kodiert für das Exoenzym Levansucrase, welches die Reaktionen Saccharose-Hydrolyse und Levan-Synthese katalysiert (Dedonder *et al.*, Methods in Enzymol. 8:500-505, 1966). Die Expression von *sacB* in *E.coli* führt zum Transport des Enzyms ins Periplasma (Steinmetz *et al.*, Mol.Gen.Genet. 191:138-144, 1983) und ist für
 35 *E.coli* und andere Gramnegative Bakterien letal auf Medien mit über 5% Sucrose (Gay *et al.*, J.Bacteriol. 164:918-921).

In dieser Erfindung wird das *sacB*-Gen zum Auffinden von Insertionssequenzen in coryneformen Bakterien eingesetzt. Die Expression des intakten *sacB*-Genes führt auch in *C.glutamicum* und anderen coryneformen Bakterien zu Letalität auf Medien mit 10% Sucrose (Beispiel 4). Kolonien mit einem
 40 inaktivierten *sacB*-Gen können daher auf derartigen Medien positiv selektioniert werden. Man erhält so die Möglichkeit, Insertionselemente, die in *sacB* inseriert sind aufzufinden.

Der IS-Fangvektor pWJ5 (Abb. 3) ist ein Derivat des Plasmides pECM2. Zur Herstellung des Plasmides pECM2 wurde das Plasmid pECM1 (Schäfer *et al.*, J.Bacteriol. 172:1663-1666, 1990) mit dem Restriktionsenzym *SaI* gespalten und mit T4-DNA-Ligase religiert. Dabei wurde ein Derivat, dem das 0,3kb *SaI*-
 45 Fragment von pECM1 fehlt erhalten und mit pECM2 bezeichnet. Der IS-Fangvektor wurde wie folgt hergestellt: Plasmid pUM24 (Ried und Collmer, Gene 57:239-246, 1987) wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RV restringiert, wodurch ein 1,9kb großes DNA-Fragment entsteht, welches das *sacB*-Gen trägt. Das Plasmid pECM2 wurde mit dem Restriktionsenzym *Xba*I gespalten und anschließend mit dem Enzym Klenow-Polymerase behandelt, um die an der Spaltungsstelle entstandenen überstehenden
 50 Einzelstrang-Enden abzudauen (Maniatis *et al.*, Molecular cloning 1,2nd ed., 5.42, 1989). Die so behandelte DNA wurde durch Phenolisierung und Alkoholfällung gereinigt und konzentriert, und anschließend mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI gespalten.

Beide Ansätze wurden vereinigt und mit T4-DNA-Ligase ligiert. Mit dem Ligationsgemisch wurden kompetente Zellen des *E.coli*-Stammes S17-1 (Simon *et al.*, Biotechnol. 1:784-794, 1983) transformiert. Die
 55 Selektion transformierter Klone erfolgte primär auf PA-Agar (17,5g Penassay Broth + 15g Agar auf 1l Medium) mit 50µg/ml Chloramphenicol. Resistente Kolonien wurden durch paralleles Auftragen auf LB-

Medium mit 10% Sucrose auf eine erfolgreiche Klonierung des *sacB*-Genes, erkennbar am sensitiven Phänotyp, nachgetestet.

Beispiel 4:

Isolierung von IS-Elementen aus coryneformen Bakterien

Der Nachweis und die Isolierung von Insertionselementen aus coryneformen Bakterien in großem Maßstab gelang durch Anwendung des *sacB*-Systems:

- 10 Der mobilisierbare Shuttle-Vektor pWJ5 (Beispiel 3) wurde durch Konjugation (DE-OS 3841453.8; Schäfer *et al.*, J.Bacteriol. 172: 1663-1666 (1990)) aus dem Mobilisatorstamm *E.coli* S17-1 (Simon *et al.*, Biotechnology 1: 784-794 (1983)) in insgesamt 20 coryneforme Rezipientenstämmen aus den Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* und *Rhodococcus* übertragen (Tabelle 1). Die Anwesenheit unveränderter pWJ5-Plasmide in den coryneformen Stämmen wurde durch Lyse der Transkonjuganten (Birnboim & Doly Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523 (1979)), Spaltung der Plasmide mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Ssp*I und Analyse der Fragmente im Agarosegel verifiziert. Jeder der 20 getesteten Stämme zeigte in anschließenden Tests Wachstum auf LB-Medium mit Km₂₅, aber kein Wachstum auf LBKm₂₅-Medium mit 10% Sucrose (Tabelle 1). Diese Sucrose-Sensitivität ist auf die Expression des intakten *sacB*-Genes auf dem Plasmid pWJ5 zu zurückzuführen, da Stämme mit dem Plasmid pECM2 (Beispiel 3) auf LBKm₂₅ mit 10% Sucrose wachsen können.

- 20 pWJ5 tragende Einzelkolonien der zu testenden Stämme wurden in LB-Flüssigmedium bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei 30 °C im Luftschüttler inkubiert. Jeweils etwa 5x10⁹ Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation für 10min bei 3000 U/min geerntet, das Pellet in 1ml LB-Medium aufgenommen und auf die Oberfläche eines auf LB-Medium platzierten 0,45µm Celluloseacetatfilter (Durchmesser 40mm, Sartorius, Göttingen, FRG) aufgebracht. Nach dem Eintrocknen erfolgte eine Inkubation der Zellen für 20h bei 38,5 °C.

- Die Filter wurden danach mit 1ml LB-Medium abgeschwemmt und je 0,1ml der unverdünnten und der im Verhältnis 1:10 mit LB-Medium verdünnten Suspension auf LBKm₂₅-Agar mit 10% Sucrose ausplattiert. Nach 2-3 tägiger Aufbewahrung bei 30 °C konnten für alle coryneformen Bakterienstämme sucroseresistente Kolonien in unterschiedlicher Häufigkeit erhalten werden (Tabelle 1). Für *Corynebacterium glutamicum* wurden pro Ansatz 2,5x10⁵ Sucrose-resistente Kolonien pro Ansatz, entsprechend einer Frequenz von 5x10⁻⁵ erhalten. 16 Sucrose-resistente Klone wurden exemplarisch durch Lyse, Restriktion der Plasmide mit den Enzymen *Bam*HI und *Ssp*I und anschließender Agarose-Gelelektrophorese untersucht. In 8 Klonen konnte eine etwa 1,45kb große Verlängerung des *sacB*-Genes im Plasmid pWJ5 nachgewiesen werden. 35 Sämtliche Insertionen wiesen Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Bcl*II, *Nco*I, *Hind*III und *Dra*I auf, die auch im Insertionselement ISCG1 (Beispiel 2) vorhanden sind.

Alle getesteten Insertionen hybridisierten mit Digoxigenin-dUTP markierter ISCG1-DNA.

- Mit Hilfe des IS-Fangvektors konnten Insertionen vom ISCG1-Typ zudem aus *C.glutamicum* AS019, *C.fascians* DM200-2, *C.fascians* DM 200-1, *C.herculis* und *B.flavum* ATCC 14067 isoliert werden (Tabelle 40 1).

Es wurde überdies eine Hybridisierung *Eco*RI-gespaltener chromosomaler DNA verschiedener coryneformer Stämme mit dem Digoxigenin-dUTP markierten 1,9kb Fragment aus der PCR-Reaktion (Beispiel 2) durchgeführt. Die Hybridisierung zeigt, daß in *C.glutamicum* ATCC 13032 und in der Mutante LT5.5 jeweils 5 Kopien von ISCG1 oder eines sehr ähnlichen Elementes auftreten.

- 45 Weiterhin wurde ISCG1 oder ein sehr ähnliches Element mittels Hybridisierung in den Stämmen *C.glutamicum* AS019 und *Brevibacterium flavum* DSM 20411 identifiziert. Durch Hybridisierung konnten keine Kopien von ISCG1 in *C.glutamicum* ATCC 13058, *C.acetoacidophilum* ATCC 21350, *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297 und in *E.coli* K12 nachgewiesen werden. Die durch Hybridisierung ermittelten Resultate sind somit in Übereinstimmung mit der mit Hilfe des IS-Fangvektors pWJ5 ermittelten Verteilung von IS-Elementen vom ISCG1-Typ in coryneformen Bakterienstämmen.

Eine Insertion anderen Typus wurde aus *B.lactofermentum* ATCC 13869 isoliert (Tabelle 1) und ISBI1 genannt.

- Diese etwa 1,4kb große Insertion befand sich ebenfalls im *sacB*-Gen von pWJ5 und weist lediglich partielle Homologie zu ISCG1 auf. Durch Hybridisierung Digoxigenin-dUTP markierter ISBI1-DNA gegen 55 *Eco*RI gesplattene Gesamt-DNA aus *B.lactofermentum* ATCC 13869 wurden 4 Kopien von ISBI1 im Genom dieses Stammes nachgewiesen.

Eine etwa 1,3kb große Insertionssequenz wurde überdies in *Rhodococcus fascians* DM200-2 (früher *Corynebacterium fascians*) identifiziert (Tabelle 1) und mit ISRF1 bezeichnet. Restriktionsanalysen und

Hybridisierungsstudien zeigten nur geringe Ähnlichkeiten zur IS_{Cg1}-Familie und zu IS_{B11}. Durch Hybridisierung Digoxigenin-dUTP markierter IS_{Rf1}-DNA gegen *Pst*I-gespaltene Gesamt-DNA aus *R. fascians* DM200-2 wurden 3 Kopien von IS_{Rf1} im Genom des Stammes nachgewiesen. Eine Kopie von IS_{Rf1} konnte auf einem endogenen Plasmid von *R. fascians* DM200-2 lokalisiert werden.

- 5 Wesentliche Eigenschaften der drei isolierten IS-Element-Typen aus coryneformen Bakterien sind in Tabelle 2 vergleichend zusammengestellt.

Beispiel 5:

10 Mutagenese von coryneformen Stämmen durch Einsatz von Insertionselementen

Das Prinzip der Mutagenese mit Insertionselementen wird am Beispiel des Stammes *C. glutamicum* ATCC 13058 und dem IS-Element IS_{B11} (Beispiel 4) dargelegt:

- Durch Restriktionsanalyse wurde eine Insertion von IS_{B11} in einem 0,65kb großen *Hind*III-*Cla*I-Fragment des *sacB*-Genes auf pWJ5 lokalisiert. Durch Restriktion des pWJ5::IS_{B11}-Plasmides mit den Restriktionsendonukleasen *Hin* dIII und *Cla*I wurde ein 2,05kb großes Fragment freigesetzt und nach Auftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese aus dem Gel isoliert. Hierzu wurde ein schmaler Streifen mit dem entsprechenden Fragment. ausgeschnitten und mit 2,5-3 Volumen 6 molarer Natriumjodid-Lösung versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation bei 55 °C wurde die DNA aus dem nun geschmolzenen Gel mit Hilfe des GeneClean Kits (BIO101 Inc. La Jolla, CA. USA) nach Angaben des Herstellers isoliert und gereinigt. Anschließend wurden die überstehenden Einzelstrang-Enden des Fragmentes mit dem Enzym Klenow-Polymerase aufgefüllt.

- Der mobilisierbare *E. coli*-Vektor pK18mob (DE-OS 4027453) wurde mit dem Restriktionsenzym *Sma*I linearisiert und nach dem Fachmann geläufigen Verfahren (Maniatis *et al.*, Molecular cloning 2nd ed. Abschnitt 1.6, Gold spring Harbor Laboratory Press, 1989) mit dem Enzym alkalische Phosphatase behandelt. Der so behandelte Vektor wurde mit dem aufgefüllten *Hin* dIII-*Cla*I-Fragment vermischt und mit dem Enzym T4-DNA Ligase ligiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend in den *E. coli*-Stamm Dh5 α - (Woodcock *et al.*, Nucleic Acids Res. 17:3469-3478, 1989) transformiert. Transformanten wurden auf LB-Medium mit Kanamycin (50 μ g/ml) und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galctosid (20 μ g/ml) ausplattiert und für 24h bei 37 °C inkubiert. Weiße Kolonien wurden auf LB-Medium mit Kanamycin (50 μ g/ml) gereinigt und der Plasmidgehalt durch Lyse der Zellen, Restriktion der Plasmid-DNA und Agarosegelelektrophorese analysiert. Klone, die das 2,05kb große Insert mit IS_{B11} in beiden Orientierungen tragen wurden identifiziert und mit pK18mob::IS_{B11}.1 und pK18mob::IS_{B11}.2 bezeichnet (Abbildung 4).

- 35 pK18mob::IS_{B11}.1 wurde aus dem Stamm *E. coli* Dh5 α isoliert und in kompetente Zellen des Stammes *E. coli* S17-1 transformiert.

- Aus dem Mobilisatorstamm *E. coli* S17-1 wurde das Plasmid pK18mob::IS_{B11}.1 durch konjugativen Transfer (Schäfer *et al.*, J.Bacteriol. 172:1663-1666, 1990, EP-A-0372230) bei auf 38,5 °C erhöhter Inkubationstemperatur nach *C. glutamicum* ATCC 13058 übertragen. Auf Selektionsmedium (LBK_{m25}Nx₅₀) wurden 1500 Transkonjuganten erhalten. 12 dieser Klone wurden exemplarisch auf ihren Plasmidgehalt hin überprüft.

- 40 Dabei wurde keine freie Plasmid-DNA nachgewiesen. 400 Transkonjuganten wurden parallel auf LBK_{m25}Nx₅₀- und MMK_{m25}Nx₅₀-Medium gestochert und für 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert. 3 Klone erwiesen sich als auxotroph, da kein Wachstum auf Minimalmedium zu beobachten war. 12 zufällig ausgewählte Transkonjugantenklone wurden in LBK_{m50}-Medium angezogen und die Gesamt-DNA isoliert, mit dem Enzym *Eco*RI gespalten und im Agarosegel aufgetrennt. Durch Hybridisierung mit Digoxigenin markierter *Eco*RI-gespaltener pK18mob::IS_{B11}.1-DNA konnte eine Integration des Vektors an unterschiedlichen Stellen in das Genom von *C. glutamicum* ATCC 13058 verifiziert werden.

50

55

GENERAL INFORMATION:

APPLICANT:

NAME: Degussa Aktiengesellschaft
 STREET: Weissfrauenstrasse 9
 CITY: Frankfurt am Main 1
 COUNTRY: Germany
 POSTAL CODE: W-6000

TITLE OF INVENTION: Method for location of insertion elements

NUMBER OF SEQUENCES: 7

COMPUTER READABLE FORM:

MEDIUM TYPE: Diskette
 COMPUTER: IBM PC compatible
 OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

CURRENT APPLICATION DATA:

APPLICATION NUMBER: 93 101279.3

INFORMATION FOR SEQUENCE ID NO: 1:

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

LENGTH: 1452 base pairs
 TYPE: nucleic acid
 STRANDNESS: single
 TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: Genomic DNA

HYPOTHETICAL: no

ANTI-SENSE: no

ORIGINAL SOURCE:

ORGANISM: Corynebacterium glutamicum
 STRAIN: ATCC 13032

FEATURE:

NAME/KEY: insertion sequence
 LOCATION: 1..1452
 IDENTIFICATION METHOD: experimentally
 OTHER INFORMATION: transposable element; identified as insertion in the lysI gene

FEATURE:

NAME/KEY: RBS
 LOCATION: 182..185
 IDENTIFICATION METHOD: by similarity with an established consensus sequence

FEATURE:

NAME/KEY: coding sequence
 LOCATION: 192..1435
 IDENTIFICATION METHOD: by similarity to some other pattern
 OTHER INFORMATION: open reading frame most probably encoding the transposase

FEATURE:

NAME/KEY: repeating unit
 LOCATION: 1..24
 IDENTIFICATION METHOD: by similarity with some other pattern
 OTHER INFORMATION: left inverted repeat

FEATURE:

NAME/KEY: repeating unit
 LOCATION: 1229..1252
 IDENTIFICATION METHOD: by similarity with some other pattern
 OTHER INFORMATION: right inverted repeat

55

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

	GGCCCTTCG GTTTTGGGGT ACATCACAGA ACCTGGGCTA GCGGT	45
5	GTAGA CCCGAAAATA AACGAGCCTT TTGTCAGGGT TAAGGTTTAG	90
	GTATCTAAGC TAACCAAACA CCAACAAAAG GCTCTACCCA TGAAG	135
	TCTAC CGGCAACATC ATCGCTGACA CCATCTGCCG CACTGCGAAC	180
10	TAGGACTCAC C ATC ACC GGC GCT TCC GAT GCA GGT GAT TAC ACC CTG 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	227
	ATC GAA GCA GAC GCA CTC GAC TAC ACC TCC ACC TGC CCA GAA TGC ile glt ala asp ala leu asp tyr thr ser thr cys pro glu cys 15 20 25	272
15	TCC CAA CCT GGG GTG TTT CGT CAT CAC ACC CAC CGG ATG CTC ATT ser gln pro gly val phe arg his his thr his arg met leu ile 30 35 40	317
	GAT TTA CCC ATC GTC GGG TTT CCC ACC AAA CTG TTT ATC CGT CTA asp leu pro ile val gly phe pro thr lys leu phe ile arg leu 45 50 55	362
20	CCT CGC TAC CGC TGC ACC AAC CCC ACA TGT AAG CAA AAG TAT TTC pro arg tyr arg cys thr asn pro thr cys lys gln lys tyr phe 60 65 70	407
	CAA GCA GAA CTA AGC TGC GCT GAC CAC GGT AAA AAG GTC ACC CAC gln ala glu leu ser cys ala asp his gly lys lys val thr his 75 80 85	452
25	CGG GTC ACC CGC TGG ATT TTA CAA CGC CTT GCT ATT GAC CGG ATG arg val thr arg trp ile leu gln arg leu ala ile asp arg met 90 95 100	497
	AGT GTT CAC GCA ACC GCG AAA GCA CTT GGG CTA GGG TGG GAT TTA ser val his ala thr ala lys ala leu gly leu gly trp asp leu 105 110 115	542
30	ACC TGC CAA CTA GCC CTC GAT ATG TGC CGT GAG CTG GTC TAT AAC thr cys gln leu ala leu asp met cys arg glu leu val tyr asn 120 125 130	587
35	GAT CCT CAC CAT CTT GAT GGA GTG TAT GTC ATT GGG GTG GAT GAG asp pro his his leu asp gly val tyr val ile gly val asp glu 135 140 145	632
	CAT AAG TGG TCA CAT AAT AGG GCT AAG CAT GGT GAT GGG TTT GTC his lys trp ser his asn arg ala lys his gly asp gly phe val 150 155 160	677
40	ACC GTG ATT GTC GAT ATG ACC GGG CAT CGG TAT GAC TCA CGG TGT thr val ile val asp met thr gly his arg tyr asp ser arg cys 165 170 175	722
	CCT GCC CGG TTA TTA GAT GTC GTC CCA GGT CGT AGT GCT GAT GCT pro ala arg leu leu asp val val pro gly arg ser ala asp ala 180 185 190	767
45	TTA CGG TCC TGG CTT GGC TCC CGC GGT GAA CAG TTC CGC AAT CAG leu arg ser trp leu gly ser arg gly glu gln phe arg asn gln 195 200 205	812
50	ATA CGG ATC GTG TCC ATG GAT GGA TTC CAA GGC TAC GCC ACA GCA ile arg ile val ser met asp gly phe gln gly tyr ala thr ala 210 215 220	857

55

	ACT AAA GAA CTC ATT CCT TCT GCT CGT CGC GTG ATG GAT CCA TTC	902
	ser lys glu leu ile pro ser ala arg arg val met asp pro phe	
	225 230 235	
5	CAT GTT GTG CCG CTT GCT GGT GAC AAG CTC ACC GCC TGC CCG CAA	947
	his val val arg leu ala gly asp lys leu thr ala cys arg gln	
	240 245 250	
	CGC CTC CAG CCG GAG AAA TAC CAG CGT CGT GGT TTA AGC CAG GAT	992
	arg leu gln arg glu lys tyr gln arg arg gly leu ser gln asp	
	255 260 265	
10	CCG TTG TAT AAA AAC CCG AAG ACC TTG TTG ACC ACG CAC AAG TGG	1037
	pro leu tyr lys asn arg lys thr leu leu thr thr his lys trp	
	270 275 280	
	TTG AGT CCT CGT CAG CAA GAA AGC TTG GAG CAG TTG TGG GCG TAT	1082
	leu ser pro arg gln gln glu ser leu glu gln leu trp ala tyr	
	285 290 295	
15	GAC AAA GAC TAC GGG GCG TTA AAG CTT GCG TGG CTT GCG TAT CAG	1127
	asp lys asp tyr gly ala leu lys leu ala trp leu ala tyr gln	
	300 305 310	
	GCG ATT ATT GAT TGT TAT CAG ATG GGT AAT AAG CGT GAA GCG AAG	1172
	ala ile ile asp cys tyr gln met gly asn lys arg glu ala lys	
	315 320 325	
	AAG AAA ATG CCG ACC ATT ATT GAT CAG CTT CCG GTG TTG AAG GGG	1217
	lys lys met arg thr ile ile asp gln leu arg val leu lys gly	
	330 335 340	
25	CCG AAT AAG GAA CTC GCG CAG TTG GGT CGT AGT TTG TTT AAA CGA	1262
	pro asn lys glu leu ala gln leu gly arg ser leu phe lys arg	
	345 350 355	
	CTT GGT GAT GTG TTG GCG TAT TTC GAT GTT GGT GTC TCC AAC GGT	1307
	leu gly asp val leu ala tyr phe asp val gly val ser asn gly	
	360 365 370	
30	CCG GTC GAA GCG ATC AAC GGA CCG TTG GAG CAT TTG CGT GGG ATT	1352
	pro val glu ala ile asn gly arg leu glu his leu arg gly ile	
	375 380 385	
	GCT CTA GGT TTC CGT AAT TTG AAC CAC TAC ATT CTG CCG TGC CTT	1397
	ala leu gly phe arg asn leu asn his tyr ile leu arg cys leu	
	390 395 400	
35	ATC CAT TCA GGG CAG TTG GTC CAT AAG ATC AAT GCA CTC TAAAACAGGA	1446
	ile his ser gly gln leu val his lys ile asn ala leu	
	405 410 415	
40	AGAGCC	1452

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

45 LENGTH: 26 base pairs
 TYPE: nucleic acid
 STRANDNESS: single
 TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: Genomic DNA

50 HYPOTHETICAL: no

ANTI-SENSE: no

55

ORIGINAL SOURCE:
 ORGANISM: *Corynebacterium glutamicum*
 STRAIN: ATCC 13032

5 FEATURE:
 NAME/KEY: repeating unit
 LOCATION: 1..24
 IDENTIFICATION METHOD: by similarity to some other pattern
 OTHER INFORMATION: left inverted repeat of insertion element ISCg1

10 SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:
 GGCCCTTCGG GTTTGGGGT ACATCA
 10 20

15 INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:
 SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 LENGTH: 26 base pairs
 TYPE: nucleic acid
 STRANDNESS: single
 TOPOLOGY: linear

20 MOLECULE TYPE: Genomic DNA
 HYPOTHETICAL: no
 ANTI-SENSE: no

25 ORIGINAL SOURCE:
 ORGANISM: *Corynebacterium glutamicum*
 STRAIN: ATCC 13032

30 FEATURE:
 NAME/KEY: repeating unit
 LOCATION: 1..24
 IDENTIFICATION METHOD: by similarity to some other pattern
 OTHER INFORMATION: right inverted repeat of insertion element ISCg1

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:
 GGCTCTTCCT GTTTAGAGT GCATTG
 10 20

35 INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:
 SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 LENGTH: 26 base pairs
 TYPE: nucleic acid
 40 STRANDNESS: single
 TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: Genomic DNA
 HYPOTHETICAL: no
 45 ANTI-SENSE: no

ORIGINAL SOURCE:
 ORGANISM: *Brevibacterium lactofermentum*
 STRAIN: DSM 20412

50 FEATURE:
 NAME/KEY: repeating unit
 LOCATION: 1..26
 IDENTIFICATION METHOD: by similarity to some other pattern

55

OTHER INFORMATION: left inverted repeat of insertion element ISB11

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

GGCTCTTCGG TTTTAGAGT GCATTG
10 20

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

LENGTH: 26 base pairs
TYPE: nucleic acid
STRANDNESS: single
TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: Genomic DNA

HYPOTHETICAL: no

ANTI-SENSE: no

ORIGINAL SOURCE:

ORGANISM: Brevibacterium lactofermentum
STRAIN: DSM 20412

FEATURE:

NAME/KEY: repeating unit

LOCATION: 1..26

IDENTIFICATION METHOD: by similarity to some other pattern

OTHER INFORMATION: right inverted repeat of insertion element ISB11

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

GGCTCTTCGG TTTTAGAGT GCATTG
10 20

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

LENGTH: 18 base pairs
TYPE: nucleic acid
STRANDNESS: single
TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: Genomic DNA

HYPOTHETICAL: no

ANTI-SENSE: no

ORIGINAL SOURCE:

ORGANISM: Rhodococcus fascians
STRAIN: DSM 20131

FEATURE:

NAME/KEY: repeating unit

LOCATION: 1..18

IDENTIFICATION METHOD: by similarity to some other pattern

OTHER INFORMATION: left inverted repeat of insertion element ISRf1

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

GGACCTGACC CCCATTG
10

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

5 LENGTH: 18 base pairs
 TYPE: nucleic acid
 STRANDNESS: single
 TOPOLOGY: linear

10 MOLECULE TYPE: Genomic DNA

 HYPOTHETICAL: no

 ANTI-SENSE: no

15 ORIGINAL SOURCE:
 ORGANISM: *Rhodococcus fascians*
 STRAIN: DSM 20131

 FEATURE:
 NAME/KEY: repeating unit
 LOCATION: 1..18
 IDENTIFICATION METHOD: by similarity to some other pattern
 OTHER INFORMATION: right inverted repeat of insertion element ISRf1

 SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

25 GGGCCCACC CCGATATG
 10

30 **Patentansprüche**

1. Verfahren zum Auffinden von Insertionselementen (IS-Elemente) oder Transposonen in coryneformen Bakterien, das umfaßt:
 - 1.1. die Konstruktion eines aus einem E.coli Mobilisatorstamm mobilisierbaren, nicht selbsttransferierbaren Vektors, zusammengesetzt aus
 - 1.1.1 einem DNA-Segment, enthaltend ein in E.coli funktionelles Replikon,
 - 1.1.2 einem zweiten DNA-Segment, enthaltend das für die Mobilisierungsfunktion codierende DNA-Fragment (Mob-site enthaltend den oriT),
 - 1.1.3 einem dritten DNA-Segment, das in Gram-positiven Bakterien homolog rekombiniert und/oder ein in coryneformen Bakterien funktionelles Replikon enthält
 - 1.1.4 einem das sacB-Gen enthaltenden DNA-Segment aus *Bacillus subtilis*,
 - 1.2. Übertragung dieses Vektors durch konjugativen Transfer in die coryneformen Rezipientenstämme,
 - 1.3. Anzucht der den Vektor enthaltenden Transkonjuganten in einem 10 % Sucrose enthaltenden Nährmedium,
 - 1.4. Lyse der Sucrose-resistenten Klone, Spaltung der Plasmide mit Restriktionsendonucleasen und Analyse der Fragmente.
2. Positives Selektionssystem zum Auffinden von Insertionselementen oder Transposonen in coryneformen Bakterien, das einen mobilisierbaren, nicht selbsttransferierbaren Vektor umfaßt, der zusammengesetzt ist aus
 - a) einem DNA-Segment, enthaltend ein in E.coli funktionelles Replikon,
 - b) einem zweiten DNA-Segment, enthaltend das für die Mobilisierungsfunktion codierende DNA-Fragment (Mob-site enthaltend den oriT),
 - 55 c) einem dritten DNA-Segment, das in Gram-positiven Bakterien homolog rekombiniert und/oder ein in coryneformen Bakterien funktionelles Replikon enthält,
 - d) einem das sacB-Gen enthaltenden DNA-Segment aus *Bacillus subtilis*.

3. Selektionssystem gemäß Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet, daß man den Vektor pWJ 5 (Fangvektor) einsetzt, der durch die in Abb. 3
wiedergegebene Restriktionskarte beschrieben wird und aus 11790 bp besteht.
- 5 4. Insertionselemente aus coryneformen Bakterien, gefunden mit dem Verfahren gemäß Anspruch 1.
5. Insertionselement des Typs ISCG1 aus *C.glutamicum*, *C. fascians*, *C.herculis* und *B.flavum*, bestehend
aus ca. 1,45 kb und mit invers repetitiven Enden von ca. 24 bp Länge.
- 10 6. Insertionselement gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es aus 1452 bp besteht und die
Basensequenz besitzt, die in den Abb. 2/1 und 2/2 wiedergegeben wird.
7. Insertionselemente des Typs ISBI1 aus *B.lactofermentum* bestehend aus ca. 1,45 kb und mit invers
repetitiven Enden von ca. 26 bp Länge.
- 15 8. Insertionselemente des Typs ISRF1 aus *C.fascians*, bestehend aus ca. 1,3 kb und mit invers repetitiven
Enden von ca. 18 bp Länge.
9. Verwendung der Insertionselemente gemäß den Ansprüchen 4 bis 8 zur Mutagenese coryneformer
20 Bakterien,
dadurch gekennzeichnet, daß man
 - 9.1. einen aus einem *E.coli* Mobilisatorstamm mobilisierbaren, nicht selbsttransferierbaren Vektor
konstruiert, zusammengesetzt aus
 - 9.1.1 einem DNA-Segment, enthaltend ein in *E.coli* funktionelles Replikon,
 - 25 9.1.2 einem zweiten DNA-Segment, enthaltend das für die Mobilisierungsfunktion codierende DNA-
Fragment (Mob-site enthaltend den *oriT*),
 - 9.1.3 einem dritten DNA-Segment, das in Gram-positiven Bakterien homolog rekombiniert und/oder
ein in coryneformen Bakterien funktionelles Replikon enthält, und
 - 9.1.4 einem das IS-Element enthaltenden DNA-Segment
 - 30 9.2. diesen Vektor durch konjugativen Transfer in den coryneformen Rezipientenstamm überträgt
und
 - 9.3. die den Vektor enthaltenden Transkonjuganten in dem gewünschten Nährmedium anzieht.
10. Verwendung von Insertionselementen gemäß den Ansprüchen 4 bis 8 zum Nachweis weiterer Kopien
35 im Genom eines Stammes,
dadurch gekennzeichnet, daß man ein mit Dioxygenin-d-UTP markiertes IS-Element DNA enthaltendes
Fragment gegen die zu untersuchende DNA aus coryneformen Bakterien hybridisiert.

40

45

50

55

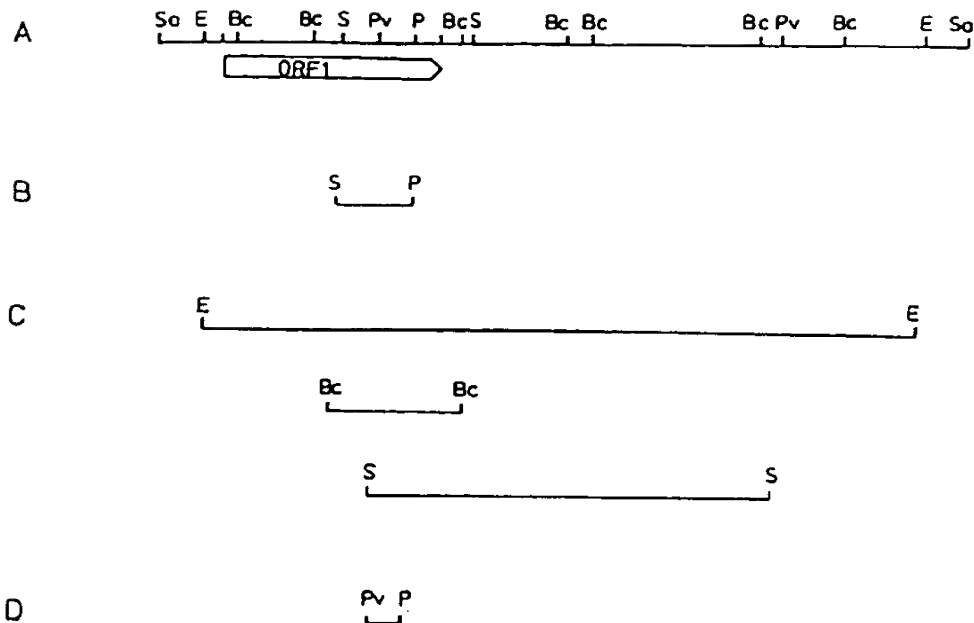


Abbildung 1:

In a ist die Restriktionskarte des 5,6 kb chromosomalen Sau3A DNA Fragmentes mit der lysI Kodierregion als Pfeil gekennzeichnet gezeigt. In b ist das als Hybridisierungssonde verwendete 505 bp große SstI-PstI DNA Fragment dargestellt. In c sind die DNA Fragmente gezeigt, die in der Mutante LT 5.5 vergrößerte sind. In d ist das 283 bp PvuII-PstI DNA Fragment dargestellt, auf dem die Insertion lokalisiert wurde.

Abkürzungen: Bc: BclI; E: EcoRI; P: PstI; Pv: PvuII; S: SstI; Sa: Sau3A

Abb. 2/1

```

GGCCCTTCGGGTTTTGGGGTACATCACAGAACCTGGGCTAGCGGTGTAGACCGGAAAATA
   10      20      30      40      50      60
AAOGAGCCTTTTGTGTCAGGGTTAAGGTTTAGGTATCTAAGCTAACCAACACCAACAAAAG
   70      80      90     100     110     120
      M K S T G N I I A D T I C R T - E
GCTCTACCCATGAAGTCTACCGGCAACATCATOGCTGACACCATCTGCGGCACTNGOGAA
  130     140     150     160     170     180
L G L T I T G A S D A G D Y T L I E A D
CTAGGACTCACCATCACCGGCGCTTCOGATGCAGGTGATTACACCCGATCGAAGCAGAC
  190     200     210     220     230     240
A L D Y T S T C P E C S Q P G V F R H H
GCACTGACTACACCTCCACCTGCCAGAATGCTCCCAACCTGGGGTGMTTGTGTCATCAC
  250     260     270     280     290     300
T H R M L I D L P I V G F P P N C L S V
      F T H R R V S T K L F I R L
ACCCACGGATGCTCATTGATTTACCATGCTGGGGTTTCCAACAACTGTTTATCOGTC
  310     320     330     340     350     360
Y L A T A A P T P H V S K S I S K Q N *
P R Y R C T N P T C K Q K Y F Q A E L S
TACCTOGCTACCGCTGCAACCAACCCACATGTAAGCAAAAGTATTTCAAGCAGAACTAA
  370     380     390     400     410     420
C A D H G K K V T H R V T R W I L Q R L
GCTGCGCTGACCACGGTAAAAAGGTACCCACCGGGTCACCGCTGGATTTTACAACGCC
  430     440     450     460     470     480
A I D R M S V H A T A K A L G L G W D L
TTGCTATTGACCGGATGAGTGTTCACGCAACCGGAAAGCACTTGGGCTAGGGTGGGATT
  490     500     510     520     530     540
T C Q L A L D M C R E L V Y N D P H H L
TAACCTGCCAACTAGCCCTCGATATGTGCGGTGAGCTGGTCTATAAGATCCTCACCATC
  550     560     570     580     590     600
D G V Y V I G V D E H K W S H N R A K H
TTGATGGAGTGTATGTTCATTGGGGTGGATGAGCATAAGTGGTCACATAATAGGGCTAAGC
  610     620     630     640     650     660
G D G F V T V I V D M T G H R Y D S R C
ATGGTGATGGGTTTGTACCGTGATTGTGATATGACCGGGCATCGGTATGACTCACGGT
  670     680     690     700     710     720
P A R L L D V V P G R S A D A L R S W L
GTCCTGCCCGGTTATTAGATGTGTCAGGTGCTAGTGTGCTGATGCTTTAAGGTCCGCGC
  730     740     750     760     770     780
G S R G E Q F R N Q I R I V S M D G F Q
TTGGCTCCCGCGGTGAACAGTTCGCAATCAGATACGGATGCTGTCCATGGATGGATTCC
  790     800     810     820     830     840

```

Abb. 2/2

G Y A T A S K E L I P S A R R V M D P F
 AAGGCTACGCCACAGCAAGTAAAGAACTCATTCCTTCTGCTCGTCGCGTGATGGATCCAT
 850 860 870 880 890 900

H V V R L A G D K L T A C R Q R L Q R E
 TCCATGTTGTGCGGCTTGCTGGTGACAAGCTCACCGCCTGCCGCAACGCCTCCAGCGGG
 910 920 930 940 950 960

K Y Q R R G L S Q D P L Y K N R K T L L
 AGAAATACCAGCGTCGTGGTTTAAAGCCAGGATCCGTTGTATAAAAAACCGGAAGACCTTGT
 970 980 990 1000 1010 1020

T T H K W L S P R Q Q E S L E Q L W A Y
 TGACCAACGACAAGTGTTGAGTCCTCGTCAGCAAGAAAGCTTGGAGCAGTTGTGGGCGT
 1030 1040 1050 1060 1070 1080

D K D Y G A L K L A W L A Y Q A I I D C
 ATGACAAAGACTACGGGGCGTTAAAGCTTGCGTGGCTTGCGTATCAGGCGATTATTGATT
 1090 1100 1110 1120 1130 1140

Y Q M G N K R E A K K K M R T I I D Q L
 GTTATCAGATGGGTAATAAGCGTGAAGCGAAGAAGAAAATGCCGACCATTATTGATCAGC
 1150 1160 1170 1180 1190 1200

R V L K G P N K E L A Q L G R S L F K R
 TTGGGGTGTTGAAGGGGCGAATAAGGAACTCGCGCAGTTGGGTGCTAGTTTGTITTAAC
 1210 1220 1230 1240 1250 1260

L G D V L A Y F D V G V S N G P V E A I
 GACTTGGTGATGTGTTGGCGTATTTTCGATGTTGGTGTCTCCAACGGTCCGGTGAAGCGA
 1270 1280 1290 1300 1310 1320

N G R L E H L R G I A L G F R N L N H Y
 TCAACGGACGGTTGGAGCATTGCGTGGGATGCTCTAGGTTTCGTAATTTGAACCACT
 1330 1340 1350 1360 1370 1380

I L R C L I H S G Q L V H K I N A L *
 ACATTCTGCGGTGCCTTATCCATTCAGGGCAGTTGGTCCATAAGATCAATGCACTCTAAA
 1390 1400 1410 1420 1430 1440

ACAGGAAGAGCC
 1450

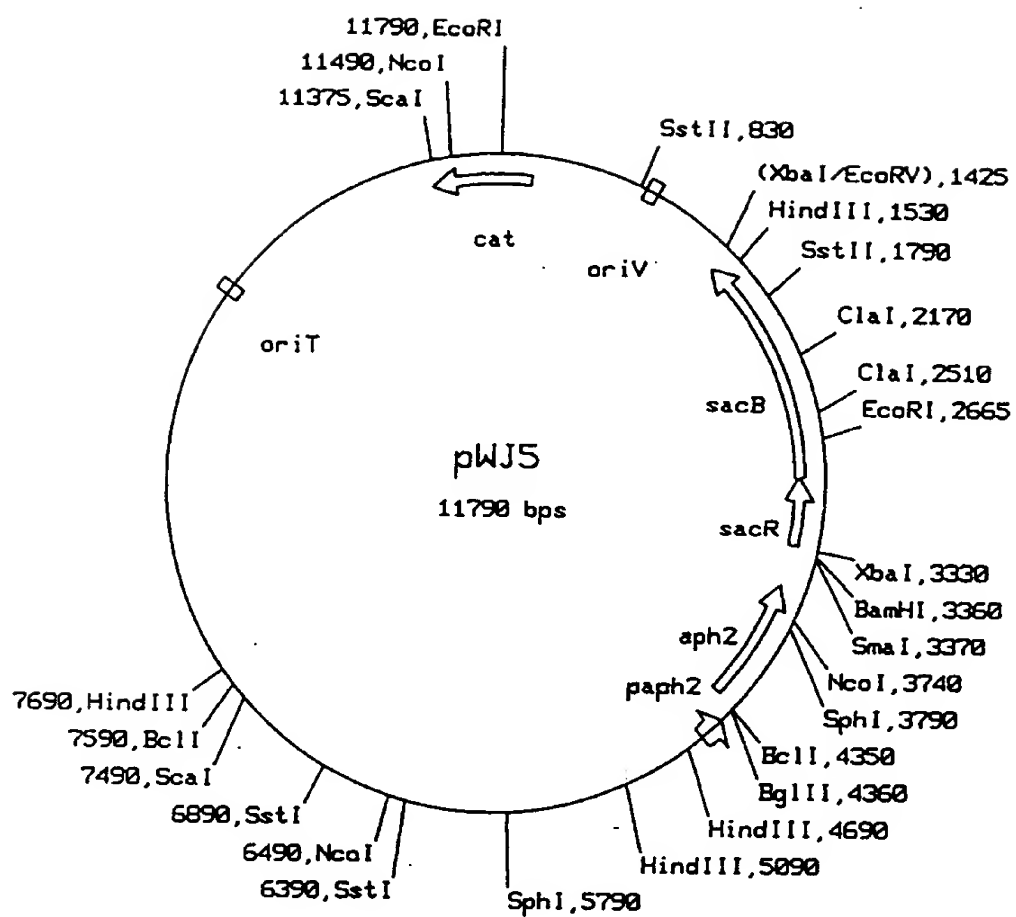


Abbildung 3

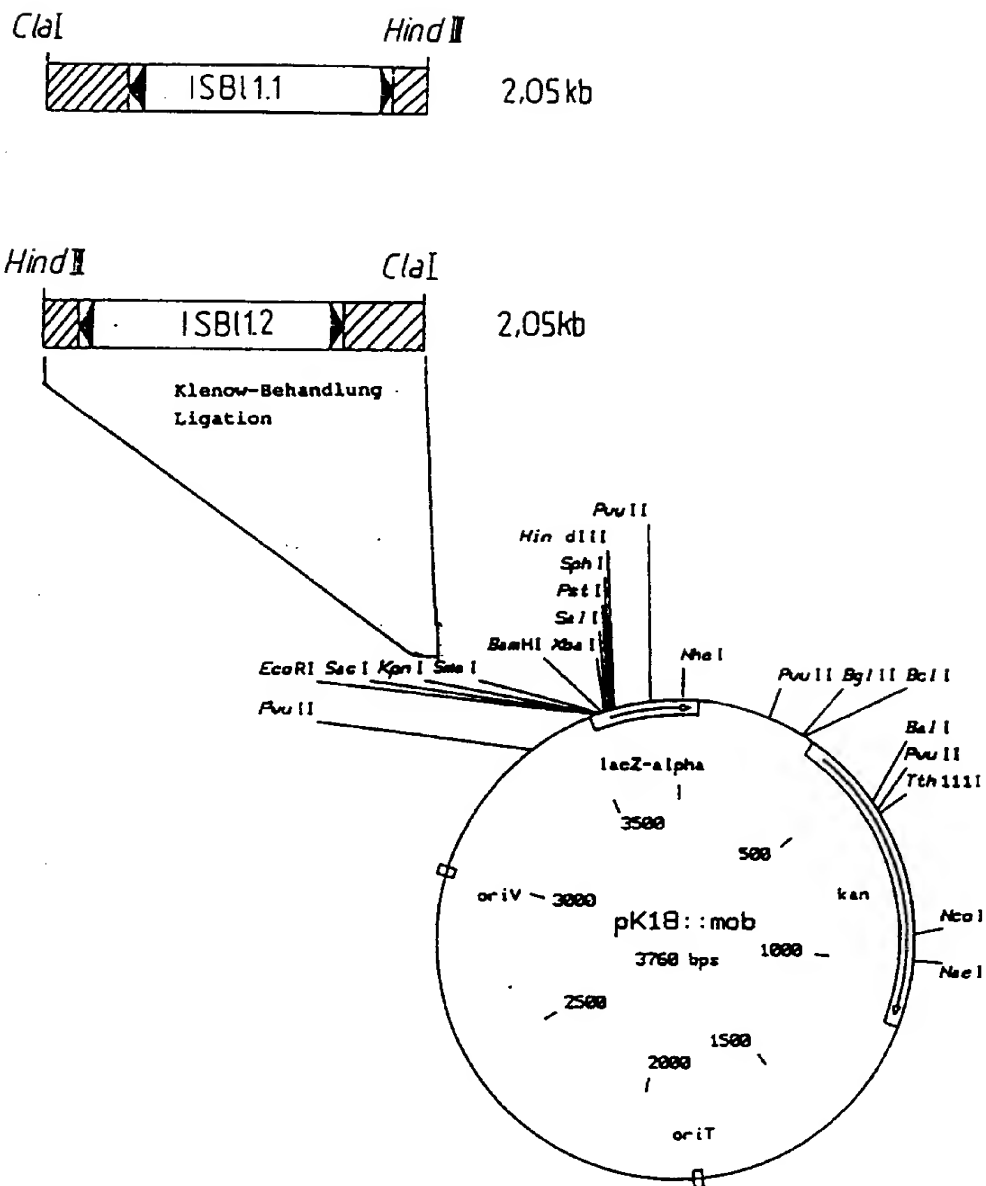


Abbildung 4:

Konstruktion der Vektoren pK18mob::ISB11.1 und pK18mob::ISB11.2

Gestreifte Flächen kennzeichnen Anteile des *sacB*-Genes.

Ausgemalte Flächen kennzeichnen die inverted repeats



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 93 10 1279
Seite 1

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
X	EP-A-0 445 385 (DEGUSSA AG) *Seite 2, Zeile 27 - Seite 4, Zeile 28; Ansprüche*	4,9	C12N15/77 C12N15/11 C12P19/34
D	& DE-A-4 027 453 ---		
X	EP-A-0 252 558 (SCLAVO S.P.A.) *Beispiele 3 und 4; Ansprüche*	4	
Y	---	10	
Y	APPLICATIONS MANUAL 1989, Seiten 1 - 3 BOEHRINGER MANNHEIM GMBH BIOCHEMICA 'DNA labeling and detection nonradioactive' ---	10	
D,A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY Bd. 164, 1985, Seiten 918 - 921 P. GAY ET AL.; 'Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria' *das gesamte Dokument*	1	
	---		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
A	EP-A-0 372 230 (DEGUSSA AG) *Ansprüche*	1	C12N
D	& DE-A-3 841 453 ---		
A	WO-A-9 100 913 (DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) *Beispiel 2; Ansprüche*	1	

	-/--		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 02 AUGUST 1993	Früher YEATS S.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument A : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer andern Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 93 10 1279
Seite 2

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
P,X	JOURNAL OF BACTERIOLOGY Bd. 174, 1992, Seiten 5462 - 5465 W. JÄGER ET AL.; 'Expression of the Bacillus subtilis sacB gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium Corynebacterium glutanicum but not in Streptomyces lividans' *das gesamte Dokument* -----	1-4	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenamt MÜNCHEN	Abschlußdatum der Recherche 02 AUGUST 1993		Prüfer YEATS S.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : literarisches Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	